プロテインシーケンサーの最適化利用のために

黒岩 真弓

東京大学農学生命科学研究科附属技術基盤センター先端機器系技術室

1. はじめに [1),2)]

タンパク質やペプチドの機能構造解析に重要なアミノ酸配列を決定する唯一の装置としてプロテインシーケンサーがある。DNA シーケンスや質量分析装置によりアミノ酸配列も推定できる昨今、この装置はメーカー[Applied Biosystems（ABI）現：life　technologies]が 3 年後にはその試薬・消耗品等の販売、製品サポートを終了することになった。しかしながら、タンパク質構造解析においては、N 末端からアミノ酸配列を決定するこの装置の重要性はなくなることはないと予想される。そのような状況の中、現在、東京大学農学生命科学研究科先端機器分析室には 2 台の ABI 製プロテインシーケンサーがある(491HT と 491cLC)。ユーザーに利用してもらう一方で依頼分析も受け付けている。今回、この装置にかかわって 4 年たち、その中で培った技術取得、将来に向けての準備等を紹介する。

2. 歴史 [1)-4)]

Edman は 1949 年にタンパク質やペプチドの N 末端からのアミノ酸配列を分析する画期的な手法(エドマン分解)を確立し、さらに、1967 年にこの方法を用いてアミノ酸配列を自動的に分析する装置を開発した。この装置は、試薬を液体で供給することから液相シーケンサーと呼ばれ、サンプル量は 250 nmol 以上必要であった。その後、多くの研究者、技術者が改良・開発研究を進め固相シーケンサーをへて、さらにコンバージョンフラスコの開発・HPLC の導入などが行われ、1981 年に Hunkapiller, Ho od らにより現在の気相シーケンサーを開発することに成功した。この装置の開発により、サンプル量は 数十 pmol レベルのきわめて微量なタンパク質やペプチドの分析が行えるようになった。その後、自動化によるアプリケーションの開発、Mac OS から Windows OS への移行もおこなわれて現在に至る。先端機器分析室にある 2 台の装置もこのあたりのもので 491HT は 10-20 pmol、491cLC においては数 pmol の分析も可能である。

3. 構成 [5),6)]

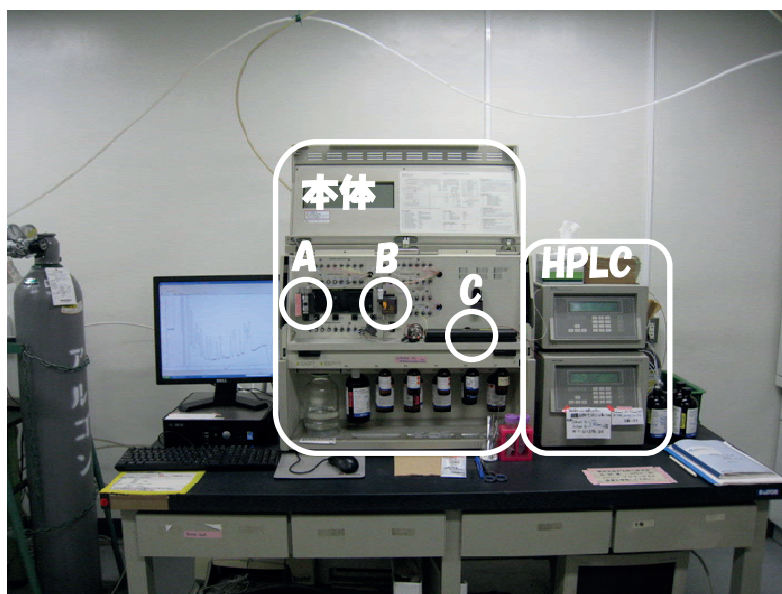
Fig. 1 は Procise 491cLC である。装置の構成は、エドマン分解を行う本体部(A:カートリッジ部、B:コンバージョンフラスコ部)、アミノ酸の分離を行う HPLC 部(C:PTH カラム)、システムの制御･データ収集を行う PC 部と大きく分けられる。試薬類はすべて Ar ガスにより送られる。

Fig. 1 Procis e 491cLC

4. 保守・管理

常に最善の状態で装置をユーザーに使用してもらうため停電時以外は常にアイドリング状態にしている。

(1) 試薬類・Ar ガスの管理

試薬は基本的にユーザーが交換することになっている。分析中に試薬がなくなるとサンプルのデータに影響を与えるの

みならず、装置故障の原因にもなるため、10 残基分析するのに必要な試薬量をユーザーの目につくところに貼り注意を喚起している。また、標準となるスタンダードは技術職員が交換する。

(2) PTH －Standard　クロマトグラムの分離状態の最適化

各サンプルの分析においては最初にスタンダードの分離を行う。このスタンダードがきちんと分離されていないとその後の各サイクルのサンプルの同定ができない。この分離状態でカラムやコンバージョンフラスコの劣化、試薬の劣化、UV ランプの劣化等が判断できる。適宜観察し、分離が悪くなれば HPLC の Gradient の変更、ならびに HPLC 溶媒の組成の微量変更を行うことにより最適化し、限界に達したところで各部品を交換している。

(3) cLC の PTH カラム圧のチェック

cLC においては、数 pmol といった微量サンプル量の検出を行うために、カラムを詰まらせないように常時送液を行っている。カラムの圧が高くなった場合にはガードカラム、PEEK Tube のチェックならびに交換などもおこなっている。ほぼ毎朝夕カラムの圧のチェックをしている。さらに、使用がないときには 1 週間に 1 回程度テストメソッドを行ってカラムがつまらないように配慮している。

(4)　講習会の開催ならびに使用方法のアドバイス

価格が 1 千万を超え、修理代も数十万に及ぶこの装置は講習会を受けないと使えないということにしている。研究室で 1 人講習会を受講し、その後は各研究室で受講者が教えるというシステムを取っている。4 年前まではメーカーにお願いしていた講習会だが、今年度は、教員と技術職員により、1 日半のスケジュールで開催した。教員は概要を、技術職員は実技の講習を担当した。適宜、初心者の方には使用時にアドバイスを行っている。

(5) メンテナンスと修理

消耗品などは基本的に技術職員が交換する。トラブルが起きるごとにマニュアルを片手にメーカーと連絡を取りまずは自分で直す努力をする。そして、どうにもならないときに初めてサービスエンジニアを呼び修理を行うことにしている。この修理の時間も貴重であり、サービスエンジニアから様々な情報を教えていただくよい機会になっている。そのおかげで装置の仕組みや分析プログラムの詳細についての勉強ができた。そして、ある程度はトラブルの原因と対処法は身についてきたと思う。

その他、廃液処理、使用簿集計・利用料金の計算等の業務も行っている。

5. ユーザー利用と依頼分析

ユーザーは本学本研究科、生物生産工学研究センター、アジア生物資源環境研究センター、分生細胞生物学研究所の利用を認めている。一方、依頼サンプルは、前述の範囲のみならず他部局の依頼も受け付けている。依頼サンプルの状態は精製された液体サンプルか PVDF 膜の該当バンド切片を準備してもらう。依頼分析において一番大変なのは出てきたクロマトグラムが何のアミノ酸であるかを判断しなければならないことである。付属の解析アプリケーションもあるが誤判断もあることから各サンプル分析の最初に出てくるスタンダードクロマトとにらめっこしながら的確な判断をする訓練をしてきた。習熟した教員にも確認を行い、おかげである程度は読めるようになったと思う。全く未知の配列のサンプルはできるだけ読む努力をするが、あらかじめ予想できる配列があればそれも依頼者から教えてもらっておくことが配列判断の助けとなっている。きれいなサンプルについては読みやすいが、多くピークが見えるクロマトなどは自分だけでは判断ができずまだまだ経験が必要である。

6. 3　年後に向けての取り組み

前述したように、この装置はあと 3 年足らずで製品サポート、試薬・消耗品・部品類の供給がなくなる。そこで、以下のことを行っている。

(1) 試薬・消耗品・部品類の調達

昨年度から他のメーカーが販売する試薬を使用しβ-ラクトグロブリンについてテストを行った。得られたクロマトグラムの分離状態は悪くなかった。消耗品についてはTubeなど一部の消耗品類は汎用のものが使われているのでそれほど手に入りにくいことはないと思われる。が、フローセンサやラチェット、電子部品などは手に入らなくなる恐れがあるためもし使わないで眠っている装置があればそこからリユースできればと願う。それが壊れたら…?　製作するしかないのだろうか…?それもまた興味がある。

(2) 利用数の確保

Fig.2　に装置の利用数の年変化を示す(2010.12 現在)。利用数が減ってきている。その理由は、2 つ考えられる。1 つは天然物からのタンパク質の抽出精製が非常に難しいということがあげられる。この精製がより簡単にできるようになればより利用も増えるのではと思う。現在は自分でサンプル精製は行っていないのだが、今後は自分でサンプル精製を行ってよりよい方法なりを見つけ出して先端機器分室 HP 等で紹介できるように努力をしたいと思う。

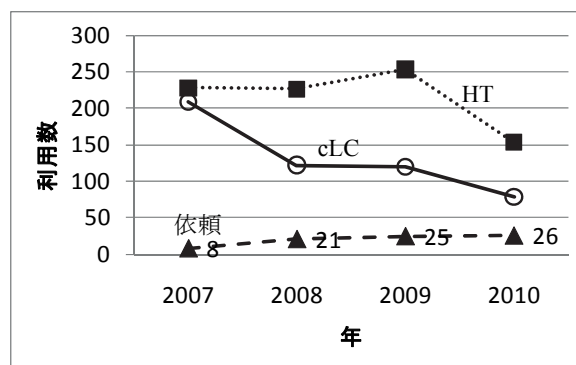



Fig. 2　プロテインシーケンサの利用数

もう 1 つは、メーカーへの依頼が増えているのではないかと思う。通常メーカーは最新の装置を使う強みがあるが、このプロテインシーケンサに関して言えばその点は大学の装置も同等である(と思われる)。今後は迅速かつ正確を目指し、大学内であるが故の低価格等をアピールし利用数を増やしていけたらと願う。

(3) メンテナンス等の整理

担当になってからの装置の状態、トラブシューティング、メンテナンスなどについて自分が行ったトライアンドエラーについては事細かにメモを取ってあるが、それは実験ノートのようなもので人に見せるには多少恥ずかしい。また、それ以外に教員、メーカーサービスエンジニアから教えていただいたこと、自分で勉強したことも多くある。これらを無駄にせず、整理してファイリングし今後の保守管理分析等に活かせるようにする。

(4) サンプルについての情報収集

依頼分析を受けるにあたり、依頼者との打ち合わせに参加してそのサンプルがどのようなものかしっかり理解することも大切だと感じている。このことは、この装置がどのようなサンプルに応用できるかということを検討し、紹介することに役立つと思う。そのため、依頼分析サンプルについての情報収集のみならず、最近のトピックスやタンパク質・ペプチド・糖鎖等についての情報収集などに常にアンテナを張り巡らすことも行う必要があると思われる。

7. まとめと謝辞

以上、これからなくなるかもしれない分析装置(プロテインシーケンサー)にかかわってきた中から得られた技術の紹介と将来へ向けての準備を紹介した。科学者は新知識の追求が任務であり、技術者はその知識を応用して新しい方法やものの開発を進めるのが任務であると西堀榮三郎先生のお言葉があるが、大学における分析装置の担当の技術職員はまさにそれができるのではないかと感じている。つまり日々技術的なことに習熟するのみならず、新しい研究サンプルを身近で扱えるからである。しかしながら、自分はやっと装置がわかってきたところで、サンプルについてはこれからである。

常日頃大変お世話になっている、先端機器分析室・長澤寛道教授、life technologies Japan　塩ノ谷義弘氏、牧野泰典氏、谷口幸浩氏、理学系研究科・鈴木道生博士、そしてユーザー、依頼主の皆様等に謝意を表する。

8.　参考文献

1)　平野　久、“遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析　ブロッティングとシークエンシング”、東京化学同人 (1993).

2)　長谷俊治, 高尾敏文, 高木淳一編, ‘タンパク質をみる-構造と挙動’化学同人（2009）.

3)　Edman, P., Begg, G., ‘A Protein Sequenator’, *Eur. J. Biochem.,* 1, 80-91(1967).

4)　Hewick, R. H., Hunkapiller, M. H., Hood, L.E., Dreyer, W. J., ‘A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator’, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7990-7997(1981).

5) Applied Biosystems 社、“Procise HT 取扱説明書(日本語簡易操作ガイド＆英語版など)”.

6) Applied Biosystems 社、“Procise cLC 取扱説明書(日本語簡易操作ガイド＆英語版など)”.